

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11360 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/53** (FR). RHEINLÄNDER, Thomas; Markgrafenstrasse 37, D-79541 Lörrach (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/07150**

(74) Anwalt: MAGER, Knut; Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Juli 2000 (25.07.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, SD, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Angaben zur Priorität:

199 38 384.7 6. August 1999 (06.08.1999) DE
60/148,686 16. August 1999 (16.08.1999) US

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



Veröffentlicht:

— *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A2
WO 01/11360

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BINDING REACTIONS THROUGH MEASUREMENT OF THE RELAXATION OF BIREFRINGENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON BINDUNGSREAKTIONEN MITTELS MESSUNG DER RELAXATION DER DOPPELRECHUNG MAGNETISCHER TEILCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a new method for detecting analytes, especially binding reactions, by means of measurement of the birefringence, and also to the use of compounds which are necessary to the analysis.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen mittels Messung der Doppelbrechung, sowie die Verwendung der dazu notwendigen Verbindungen in der Analytik.

**Verfahren zur Detektion von Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation
der Doppelbrechung magnetischer Teilchen**

5 Die Erfindung betrifft ein neues in-vitro-Verfahren zur Detektion von Analyten bzw.
Bindungsreaktionen, bei denen ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als
Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden,
welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Relaxation der Doppelbrechung als
Meßgröße bestimmt wird, sowie die Verwendung der geeigneten ferro- oder
10 ferrimagnetischen Substanzen in diesem Verfahren.

In der deutschen Patentschrift DE 195 03 664 C2 wird ein Verfahren zur
magnetorelaxometrischen quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und
Festphasen beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Assayverfahren, bei dem zunächst
15 strukturspezifische Substanzen mit frei beweglichen ferri- oder ferromagnetischen
kolloidalen Teilchen geeigneter magnetischer Relaxationszeit und mit geeignetem
magnetischem Moment markiert werden und anschließend diese markierten
strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden flüssigen oder
immobilisierten Probe eingesetzt werden. Die zu vermessende Probe wird dann mittels
20 eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert, und nach Abschalten des
äußeren Feldes wird die Relaxation der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen mittels
geeigneter Magnetfeldsensoren vermessen, wobei die durch spezifische Bindung
veränderte Relaxationszeit und/oder die durch das Ausmaß der Bindung veränderte
Relaxationsamplitude zur Analyse herangezogen wird. Auf diese Weise ist es z.B.
25 möglich, quantitativ die Konzentration eines Antikörpers gegen Collagen zu bestimmen.

Der Nachteil der Methode besteht unter anderem darin, daß der Versuchsaufbau zur
Durchführung des Verfahrens sehr aufwendig ist. Zur Messung des Magnetfeldes werden
SQUIDs (Superconducting QUantum Interference Devices) verwendet, die sich in einem
30 speziellen Kryostaten befinden und aufwendig mit flüssigem Helium gekühlt werden
müssen. Hinzu kommt, daß für hochempfindliche Messungen magnetische Störfelder
unterdrückt werden müssen, weshalb das Verfahren derzeit nur in einem sehr aufwendig
magnetisch abgeschirmten Raum durchgeführt werden kann. Weitere Probleme der

magnetischen Meßtechnik ergeben sich durch eine technisch bedingte Totzeit, wodurch Informationen über den entscheidenden Anfangsteil des Relaxationssignals nicht zugänglich sind, sowie ein Untergrundsignal, das kompensiert werden muß.

5 Weiter ist bekannt, daß Ferrofluide Doppelbrechung zeigen, wenn sich bei Anlegen eines magnetisierenden Feldes die ferri- oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen des Ferrofluids als Ganzes in Richtung des Feldes ausrichten. Nach Abschalten des Feldes kommt es dann durch thermische Reorientierung der magnetischen Teilchen zu einer Relaxation der Doppelbrechung. Dieses Relaxationssignal ist auch als "magnetic
10 transient birefringence" bekannt. Die Zeitkonstante dieses Relaxationsprozesses hängt von der Temperatur, der Viskosität der Trägerflüssigkeit und dem hydrodynamischen Volumen der magnetischen Teilchen ab. Durch Messung der Relaxation der Doppelbrechung kann dann das hydrodynamische Volumen der magnetischen Teilchen bestimmt werden (siehe Bacri et al., „Magnetic transient birefringence of ferrofluids:
15 particle size determination“, J. Physique 48 (1987), 1385-1391).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein neues in-vitro-Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen unter Verwendung magnetischer Teilchen zu entwickeln, das die Nachteile des bekannten Verfahrens nach DE 195 03 664 C2
20 überwindet, insbesondere wesentlich einfacher durchzuführen ist, und eine Detektion der Analyten bzw. Bindungsreaktionen mit einer vergleichbaren Empfindlichkeit ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst, welche in den Patentansprüchen definiert wird.

25 Es wurde gefunden, daß die Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen in Flüssigphasen gelingt, wenn ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden und die Relaxation der Doppelbrechung als Meßgröße bestimmt wird. Das neue Verfahren detektiert nicht mehr
30 das durch die Reorientierung der magnetischen Momente der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen abklingende magnetische Feld der Probe, sondern die Relaxation der Doppelbrechung als Maß für die Reorientierung der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen in der Probe. Es wurde überraschend gefunden, daß die

Empfindlichkeit der Messung der Relaxation der Doppelbrechung mit der Empfindlichkeit der direkten Messung der Relaxation der Magnetisierung der Probe vergleichbar ist.

5 Das neue Verfahren beruht auf einer speziellen Meßtechnik, die es erlaubt, nach Ausrichtung der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes in der Probe eine Doppelbrechung zu erzeugen und nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes die Relaxation der Doppelbrechung zu bestimmen. Die oben geschilderten Nachteile der bekannten Meßtechnik werden mit
10 dem neuen Verfahren überwunden.

Das Verfahren wird mit einer Meßanordnung durchgeführt, die zunächst eine Ausrichtung der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen der zu untersuchenden Probe mittels eines geeigneten Magnetfeldes erlaubt und anschließend die Messung
15 der Relaxation der Doppelbrechung dieser Substanzen ermöglicht.

Diese Meßanordnung enthält im allgemeinen eine Vorrichtung zur Erzeugung polarisierten Lichtes, eine Vorrichtung zur Aufnahme der Probe, eine Vorrichtung zur Aufmagnetisierung der Probe mit Magnetpulsen oder einem Magnetfeld variabler Frequenz, sowie eine Vorrichtung zur Analyse der Polarisationsrichtung polarisierten
20 Lichtes.

Ein Ausführungsbeispiel für eine Vorrichtung, die zur Durchführung des Verfahrens geeignet ist, umfaßt z. B. eine optische Bank, auf der ein Laser, ein Polarisator, eine Küvette mit der Probe, ein Analysator und ein Detektor angeordnet sind. Die Probe wird in eine Magnetisierungsspule eingebracht, die über eine Stromversorgung und
25 einen Pulsgenerator angesteuert wird, und das Meßsignal wird zur Auswertung zu einer Datenverarbeitungsanlage geführt. Eine solche Vorrichtung ist schematisch in Fig. 1 dargestellt. Dabei zeigt (1) einen He-Ne-Laser, (2) einen Polarisator, (3) eine Küvette mit Probe, (4) die Magnetisierungsspulen, (5) eine $\lambda/4$ -Platte (optional), (6) einen Analysator und (7) einen Photodetektor. Eine derartige Vorrichtung wird z.B. in
30 J. Physique Lett., Vol. 46, 1985, L-1199 – L-1205, beschrieben.

Besonders empfindlich kann nach Aufmagnetisierung der Probe (Stärke der Pulse z.B. 10 mT, Dauer z.B. 2 ms, Pause z.B. 20 ms) und nach Abschalten des Feldes die Relaxation der Doppelbrechung mittels hochempfindlicher Photosensoren, wie z.B. Pin-Dioden oder Avalanche-Dioden, gemessen werden. Zur Verbesserung des Signal-

5 Rausch-Verhältnisses werden mehrere Messungen gemittelt. Alternativ zur Messung der Relaxation der Doppelbrechung im Zeitbereich kann auch eine Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich durchgeführt werden. Dabei wird eine Reihe von Messungen vorgenommen, bei denen die Probe magnetischen Wechselfeldern ausgesetzt ist und die Doppelbrechung in Bezug auf das magnetisierende

10 Feld mit Betrag und Phase detektiert wird. Diese Meßgröße kann in eine komplexe Form transformiert werden, wobei aus Real- und Imaginärteil dieser komplexen Doppelbrechung Informationen über die Relaxationszeiten der Doppelbrechung gewonnen werden können.

15 Wie bereits in der deutschen Patentschrift DE 195 03 664 C2 beschrieben wurde, relaxiert die Magnetisierung frei beweglicher ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen nach Abschalten eines äußeren magnetisierenden Feldes innerhalb der Meßzeit durch zwei verschiedene Mechanismen:

20 (i) Drehung des gesamten kolloidalen Teilchens innerhalb der umgebenden Flüssigkeit, wobei die Zeitkonstante vom hydrodynamischen Durchmesser der Teilchen, der Viskosität der Trägerflüssigkeit und der Temperatur abhängt, was hauptsächlich Parameter der Umgebung der Teilchen reflektiert, dieser Mechanismus wird im folgenden auch als Brownsche Relaxation bezeichnet

25 und

(ii) Drehung des internen Magnetisierungsvektors innerhalb des magnetischen Kerns der kolloidalen Teilchen, wobei die Zeitkonstante sehr empfindlich von Material und Form (Anisotropiekonstante des verwendeten Teilchenmaterials), Volumen und der Temperatur des magnetischen Kerns der verwendeten

30 Teilchen abhängt. Dies sind im wesentlichen intrinsische Parameter der Partikel, dieser Mechanismus wird auch als Néelsche Relaxation bezeichnet.

Diese beiden Mechanismen bestimmen ebenfalls die Veränderung der Magnetisierung eines Systems frei beweglicher ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen bei Einschalten eines äußeren Magnetfeldes.

5 In Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes zeigen Ferrofluide keine Doppelbrechung. Voraussetzung für die Erzeugung der Doppelbrechung ist die Drehung des gesamten Teilchens durch ein äußeres Magnetfeld, mit anderen Worten eine Reaktion auf das angelegte Magnetfeld nach dem Brownschen Mechanismus. Teilchen, die nach dem Néel-Mechanismus auf ein äußeres Magnetfeld reagieren, tragen nicht zur

10 Doppelbrechung bei. Dominierend ist der Prozeß mit der kürzeren Relaxationszeit. Deshalb tragen zur Doppelbrechung nur Teilchen bei, deren Brown-Relaxationszeit kürzer ist als ihre Néel-Relaxationszeit.

15 Wenn in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays ferro- oder ferrimagnetische Substanzen eingesetzt werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen im ungebundenen Zustand schneller verläuft als die Néelsche Relaxation, kann durch die Änderung des dominierenden Relaxationsmechanismus beziehungsweise durch die Vergrößerung des Teilchenvolumens, welche durch die Bindung eintritt, der Anteil gebundener magnetischer Marker neben gleichzeitig in der 20 Meßprobe vorhandenen ungebundenen magnetischen Markern bestimmt werden.

25 Wie bei dem in DE 195 03 664 C2 beschriebenen Verfahren werden die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert. Diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen werden der zu vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe beigesetzt und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert. Nach Abschalten des äußeren Feldes wird die Relaxation der Doppelbrechung oder die Doppelbrechung im Frequenzbereich bestimmt.

30

Das Verfahren wird bevorzugt so durchgeführt, daß

-6-

(i) die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend

5 (ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden,

(iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und

(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung der magnetischen Marker vermessen wird.

10 Das Verfahren kann auch so durchgeführt werden, daß

(i) Analyte zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend

15 (ii) diese magnetisch markierten Analyte in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, welcher Substanzen zugesetzt wurden, die die Analyte spezifisch binden, und

(iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und

(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung 20 der magnetischen Marker vermessen wird.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt hier, wie auch bei den nachfolgend beschriebenen kompetitiven Assayverfahren, in einer dem Fachmann bekannten 25 Weise, d.h. analog zu den Verfahren wie sie bei Immunoassays oder Radioassays angewandt werden.

In beiden vorgenannten Fällen kann zur Analyse auch die Messung der durch die Bindung veränderten Doppelbrechung im Frequenzbereich herangezogen werden.

30 Die bisher nur in Ausnahmefällen mögliche Diskriminierung zwischen gebundenen und ungebundenen Markern wird durch die Ausnutzung ihrer unterschiedlichen

Relaxationsmechanismen oder die durch die Bindung verursachte Beeinflussung der Relaxationszeit des magnetischen Markers ermöglicht.

- 5 In flüssiger Phase können Analyte dadurch nachgewiesen werden, daß die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst
 - (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden, wobei diese Substanzen so gewählt werden, daß die Brownsche Relaxation zumindest eines Teils dieser Substanzen unter den Meßbedingungen eine
 - 10 kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend
 - (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, und
 - (iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und
 - 15 (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Markern zur Analyse herangezogen wird.
- 20 Als Meßgröße kann auch die Doppelbrechung der Probe im Frequenzbereich bestimmt werden.

Auch in diesem Fall ist es möglich, anstelle strukturspezifischer Substanzen die nachzuweisenden Analyte mit den magnetischen Markierungen zu kombinieren.

- 25 Unter strukturspezifischen Substanzen sind alle Substanzen zu verstehen, die spezifisch an bestimmte Strukturen binden. Unter strukturspezifischen Substanzen sind insbesondere Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin bindende Substanzen wie Avidin bzw. Streptavidin, Extravidin oder Neuravidin, spezifisch an
- 30 Rezeptoren bindende Agonisten wie Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipoproteine etc. zu verstehen. Als strukturspezifische Substanzen sind Substanzen

bevorzugt, deren Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt.

Insbesonders bevorzugt sind Substanzen deren Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt.

- 5 Die strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Analyte lassen sich mit Hilfe von in der Immuno-, Peptid- und Proteinchemie geläufigen Verfahren mit den ferri- oder ferromagnetischen Teilchen markieren. Besonders vorteilhaft sind kovalente Bindungen zwischen den strukturspezifischen Substanzen beziehungsweise den nachzuweisenden Analyten mit den die stabilisierende Hülle der ferri- oder
- 10 ferromagnetischen Teilchen bildenden Substanzen. Beispiele für besonders geeignete Methoden sind die Aktivierung und Kopplung mittels Carbodiimiden [Jakoby and Wilchek, eds.; Methods Enzymol. (1974) 34], die Bildung von Schiff'schen Basen nach Einwirkung von Periodaten auf Kohlenhydrate enthaltende Verbindungen (Wicheck and Bayer, eds., Methods Enzym 184:177), die gegebenenfalls zur weiteren
- 15 Stabilisierung anschließend noch reduziert werden, die Kopplung mittels Glutardialdehyd [Heitzmann and Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3537], die Quervernetzung bromoacetylierter Teilchen mit thiolierten Substanzen [Angerer et al.; Cell 9 (1976) 81], sowie die reduktive Alkylierung (Bayer et al.; J. Histochem. Cytochem. 24 (1976) 933].
- 20 Als Substanzen für die magnetische Markierung können alle ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Materialien verwendet werden, die sich in einem zur Detektion geeigneten Medium dispergieren lassen. wobei die Néelsche Relaxationszeit zumindest eines Teils der magnetischen Markierungen unter den Meßbedingungen
- 25 größer als die Brownsche Relaxationszeit dieser magnetischen Markierungen ist. Besonders geeignet sind alle ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Teilchen mit Brownschen Relaxationszeiten in wäßrigen Medien im Bereich von 10^{-8} - 10^{-1} s und entsprechend längeren Néelschen Relaxationszeiten. Für die Durchführung der Messungen muß die Viskosität des verwendeten Dispergiermediums mit den
- 30 Relaxationszeiten der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Teilchen und der Meßzeit abgestimmt werden, da das Suspensionsmedium wesentlich die Zeitkonstante der Brownschen Relaxation bestimmt. Dabei berücksichtigt man die Temperaturabhängigkeit der Viskosität des Dispergiermediums.

Bevorzugt sind insbesondere ferromagnetische oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen aus Eisen, Eisenoxiden, Bariumferriten, Strontiumferriten, Kobalt, Nickel, Nickelferriten, Kobaltferriten und Chromdioxid, deren Néelsche Relaxationszeit 5 größer als die Brownsche Relaxationszeit ist.

Die Verwendung von magnetischen Markierungen mit eng verteilten Partikelgrößen und/oder magnetischen Momenten bzw. Brownschen und Néelschen Relaxationszeiten ist im allgemeinen vorteilhaft. Eine Auf trennung magnetischer Markierungen in 10 Fraktionen mit enger Verteilung der Partikelgrößen kann z.B. durch chromatographische Verfahren oder unter Verwendung spezieller Filtrationsverfahren (z.B. Glaskapillarsysteme oder Tangentialfiltration), durch die Verwendung von Molekularsieben oder mittels Zentrifugation erreicht werden. Magnetische Markierungen mit möglichst einheitlichen Momenten lassen sich z.B. durch 15 Klassierung in einem magnetischen Gradientenfeld herstellen.

Die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen können mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, sonstigen Monomeren, Oligomeren oder Polymeren und/ oder Lipiden 20 stabilisiert sein.

Die Teilchengrößen der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen liegen vorteilhafterweise zwischen 1 nm und 100 µm. Bevorzugt sind kolloidale Teilchen mit Teilchengrößen zwischen 1 nm und 400 nm. Besonders bevorzugt sind 25 Teilchengrößen zwischen 1 nm und 100 nm.

Als magnetische Marker können auch ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit einer stabilisierenden Hülle aus der strukturspezifischen Substanz oder dem nachzuweisenden Analyten hergestellt werden, indem die Teilchen nach 30 Herstellung direkt in eine Lösung der strukturspezifischen Substanz, gegebenenfalls in Gegenwart weiterer Hilfsstoffe wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate sowie natürliche, synthetische oder partialsynthetische oberflächenaktive Substanzen usw. gebracht

werden, bzw. direkt in Gegenwart der strukturspezifischen Substanzen hergestellt werden.

Geeignete magnetische Marker und diese Teilchen enthaltende Suspensionen werden 5 beispielsweise in der WO 92/12735, der WO 92/22586, der EP 0 186 616 und der US 4,101,435 beschrieben. Es können prinzipiell auch magnetische Teilchen verwendet werden, die üblicherweise als Kontrastmittel für die Kernresonanztomographie verwendet werden, wie z.B. Resovist, Lumirem, Feridex, Combidex, Abdoscan und Clariscan.

10

Verbindungen, die aus kolloidalen Suspensionen frei beweglicher ferrimagnetischer oder ferromagnetischer Teilchen und strukturspezifischen Substanzen beziehungsweise nachzuweisender Analyte bestehen, wurden bereits in der deutschen Patentschrift DE 195 03 664 C2 beschrieben.

15

Die Verbindungen können auch aus Kombinationen mehrerer ferromagnetischer oder ferrimagnetischer Teilchen mit diskriminierbaren Relaxationszeiten bestehen, da bei Verwendung von unterschiedlichen magnetischen Markierungen mit jeweils sehr enger Verteilung der Relaxationszeiten und/oder magnetischen Momenten für 20 verschiedene strukturspezifische Substanzen, bzw. Analyte innerhalb einer Probe individuell diskriminierbare Meßergebnisse erzielt werden können. Dadurch wird eine direkte simultane Bestimmung mehrerer Analyte ermöglicht.

Als Suspensionsmedien kommen alle Flüssigkeiten in Betracht, in denen die 25 Verbindungen frei beweglich sind. Besonders geeignet sind Wasser, wäßrige Lösungen grenzflächenaktiver Hilfsstoffe, wie z.B. Tenside oder oligomere oder polymere Kohlenhydrate und Proteine, sowie Mischungen aus Wasser mit Alkoholen wie z.B. Glycerol und Polyethylenglykol. Die Suspensionsmedien können zusätzlich den osmotischen Druck verändernde Hilfsstoffe wie z.B. Kochsalz enthalten. 30 Des Weiteren können den pH-Wert bestimmende Puffersubstanzen, wie z.B. Phosphate, enthalten sein. Besonders bevorzugt sind Suspensionsmedien mit geeigneten optischen Eigenschaften wie geringer Absorption und Doppelbrechung. Alternativ kann die Lichtquelle so gewählt werden, daß das Licht möglichst wenig vom

Suspensionsmedium absorbiert wird und insbesondere auch biologische Suspensionsmedien verwendet werden können.

Die Verbindungen aus den ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen

5 Teilchen mit strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Analyten können auch in getrockneter Form, gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Hilfsstoffen die z.B. die Trocknung erleichtern oder die Stabilität des getrockneten Produkts erhöhen, vorliegen (z. B. als Lyophilisate) und erst kurz vor der Messung in das Suspensionsmedium überführt werden.

10

Aufgrund des auf physikalischen Mechanismen beruhenden Bindungsnachweises können unspezifische Meßsignale (Matrixphänomene) weitgehend ausgeschlossen werden. Die Spezifität des Verfahrens hängt somit nur noch von der "wahren" Spezifität der strukturspezifischen Substanz (Kreuzreaktivität von Antikörpern, 15 unspezifische Bindung von Liganden) ab. Aufgrund der hohen Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die sonst üblichen Detektionsgrenzen von Bindungsassays mühelos unterschritten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann z.B. in der Fertilität, Histokompatibilität,

20 Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik, Lebensmittelchemie und medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des

25 Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

Beispiele

1. Messung einer Verdünnungsreihe von Dextran-Magnetit:

5

Vorgehen: Die Ausgangsprobe (mit Dextran gecoatetes Eisenoxid, hergestellt nach der Methode von M. Hasegawa and S. Hakukoku, U.S. Patent 4101435 (1978), Hersteller: Meito Sangyo) lag in einer Konzentration von 1 mol Fe/l vor. Daraus wurden jeweils um den Faktor 10 mit dest. Wasser verdünnte Proben hergestellt (Konzentrationsbereich 10⁻¹ 10 - 10⁻⁶ mol Fe/l). Es wurde ebenfalls eine Vergleichsprobe mit destilliertem Wasser untersucht. Zur Messung wurde von allen Proben ein Volumen von 1 ml in die Küvette gefüllt.

Alle hier dargestellten Messungen wurden mit dem gleichen Protokoll durchgeführt: Die Proben wurden für eine Dauer von 2 ms wiederholt mit einem Magnetcycles der Stärke 15 100 Oe (10 mT) aufmagnetisiert. Die Pause zwischen den Pulsen betrug 20 ms. Zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses wurden 256 Einzelmessungen gemittelt.

Ergebnis: Für die Vergleichsprobe mit destilliertem Wasser und die Probe der Konzentration 10⁻⁶ mol Fe konnte kein Relaxationssignal detektiert werden (Vgl. Fig. 2, Relaxation in aqua dest, bzw. Fig. 3, Relaxation der Probe mit 10⁻⁶ mol Fe/l). 20 Die Relaxation einer Probe der Konzentration von 10⁻⁵ mol/l Fe war detektierbar und ist in Fig. 4 gezeigt.

Die im Probenvolumen von 1 ml enthaltene Stoffmenge Fe dieser Probe beträgt 10 nmol. Beachtet man, daß eigentlich nur das im Laserstrahl befindliche Volumen von ca. 2 x 2 x 25 10 mm (40 µl) zum Signal beiträgt, ergibt sich eine Nachweismenge von 0,4 nmol Fe. Das ist in der Größenordnung der Nachweisempfindlichkeit des in DE 195 03 664 C2 beschriebenen Verfahrens. Der neue Meßplatz wurde nicht speziell auf hohe Nachweisempfindlichkeit optimiert. Die eingesetzten Teilchen enthalten nur eine sehr kleine Fraktion von Teilchen, die nach Brown ausgerichtet werden und damit zum Signal 30 beitragen.

2. Messung des Einflusses der Zugabe von Biotin-BSA zu mit Streptavidin gekoppeltem Dextran-Magnetit auf die Relaxation der Doppelbrechung:

Vorgehen: Die Sonde (Dextran-Magnetit aus Beispiel 1, gekoppelt mit Streptavidin) lag 5 in einer Ausgangskonzentration von 2,66 mmol Fe/l vor. Für die Messungen wurde eine Probe 1 bestehend aus 100 µl der Sonde verdünnt mit 400 µl BSA-PBS (PBS: Phosphate Buffered Saline) Puffer hergestellt. Das Relaxationssignal dieser Probe wurde gemessen. Danach wurden einmalig 40 µl in BSA-PBS Puffer verdünntes Biotin-BSA 10 (Absolutmenge 400 ng Biotin-BSA) zu dieser Probe zugegeben. Danach wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mischung das Relaxationssignal gemessen.

Als Kontrolle wurde eine Probe 2 bestehend aus 100 µl Dextran-Magnetit, gekoppelt mit Streptavidin (verdünnt in 400 µl BSA-PBS Puffer) mit 5 µl freiem Biotin (1:10 verdünnt, Ausgangskonzentration 1 mg/ml) abgesättigt. Auch hier wurde einmalig 40 µl 15 in BSA-PBS Puffer verdünntes Biotin-BSA (Absolutmenge 400 ng Biotin-BSA) zugegeben, und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mischung das Relaxationssignal gemessen.

Ergebnis: Das Relaxationssignal von Probe 1 war deutlich zu beobachten. Nach Zugabe des Biotin-BSA zeigte sich eine signifikante Zunahme der Relaxationszeit (vgl. Fig. 5). Diese Verlängerung der Relaxationszeit ist durch die Zunahme des hydrodynamischen 20 Teilchendurchmessers der Sonde durch Biotin-BSA induzierte Aggregation bzw. Quervernetzung zu erklären.

Auch Probe 2 zeigte ein deutliches Relaxationssignal. Die Zugabe des Biotin-BSA in 25 BSA-PBS Puffer zu dieser Probe führte jedoch nicht zu einer Veränderung der Relaxationszeit (vgl. Fig.6).

Der daraus zu schließende unveränderte hydrodynamische Teilchendurchmesser zeigt, daß es durch die Absättigung der Bindungsstellen des Streptavidin mit freiem Biotin nicht mehr zu einer durch Biotin-BSA induzierten Aggregation bzw. Quervernetzung der 30 Sonde kommt. Damit wurde die Spezifität der Bindungsreaktion bei Probe 1 nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen, bei denen ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Relaxation der Doppelbrechung als Meßgröße bestimmt wird.
5
2. Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen, bei denen ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Relaxation der Doppelbrechung im Frequenzbereich als Meßgröße bestimmt wird.
10
3. Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden, wobei die Brownsche Relaxation zumindest eines Teils dieser Substanzen unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation.
15
4. Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen, dadurch gekennzeichnet, daß
20
 - (i) die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend
 - (ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden,
25
 - (iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und
 - (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung der magnetischen Marker ver messen wird.
- 30
5. Verfahren zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen, dadurch gekennzeichnet, daß

-15-

(i) Analyte zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend

(ii) diese magnetisch markierten Analyte in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, welcher Substanzen zugesetzt wurden, die die Analyte spezifisch binden, und

5 (iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und

(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung der magnetischen Marker vermessen wird.

10 6. Verfahren zur Detektion von in flüssiger Phase vorliegenden Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß

(i) die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden, wobei die Brownsche Relaxation zumindest eines Teils dieser Substanzen unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend

15 (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, und

(iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und

20 (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung der magnetischen Marker vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Markern zur Analyse herangezogen wird.

25 7. Verfahren zur Detektion von in flüssiger Phase vorliegenden Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß

(i) Analyte zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden, wobei die Brownsche Relaxation zumindest eines Teils dieser Substanzen unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend

30

- (ii) diese magnetisch markierten Analyte in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, welcher Substanzen zugesetzt wurden, die die Analyte spezifisch binden, und
- 5 (iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und
- (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Doppelbrechung der magnetischen Marker vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Markern zur Analyse herangezogen wird.

10

- 8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß den zu vermessenden Proben zusätzlich die Analyte spezifisch bindende Substanzen zugesetzt wurden.
- 15 9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion anstelle der Messung der Relaxation der Doppelbrechung die Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich herangezogen wird.

20

- 10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen wie Avidin bzw. Streptavidin, Neutravidin oder Extravidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.

25

- 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die an Rezeptoren bindenden Agonisten Zytokine, Lymphokine oder Endotheline sind.
- 30 12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l)⁻¹ haben.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine Bestimmung von zwei oder mehreren verschiedenen Analyten in einer Probe durchgeführt wird.
- 5 14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zwei oder mehrere ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit diskriminierbaren Brownschen Relaxationszeiten verwendet werden.
- 10 15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 100 µm haben.
- 15 16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden und/oder Lipiden stabilisiert sind.
- 20 17. Verwendung von Verbindungen aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation der Doppelbrechung oder mittels Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich.
- 25 18. Verwendung von Verbindungen aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit nachzuweisenden Substanzen zur Detektion von Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation der Doppelbrechung oder mittels Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich.
- 30 19. Verwendung von Verbindungen, die aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen bestehen, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation, zur Detektion von Analyten bzw. Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation der Doppelbrechung oder mittels Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich.

20. Verwendung von Verbindungen, die aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit nachzuweisenden Substanzen bestehen, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation, zur Detektion von Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation der Doppelbrechung oder mittels Messung der Doppelbrechung im Frequenzbereich.
5
21. Verwendung von Verbindungen in Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen enthalten, deren Teilchengröße im Bereich von 1 bis 100 µm liegt.
10
22. Verwendung von Verbindungen in Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen enthalten, die mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, Polymeren und/oder Lipiden stabilisiert sind.
15
23. Verwendung von Verbindungen in Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen strukturspezifische Substanzen enthalten, die Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
20
24. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 16 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik, Lebensmittelchemie und medizinischen Diagnostik.
25

25. Verwendung von Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen oder von Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen mit nachzuweisenden Analyten in Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 16.

5

26. Verwendung einer Vorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung eine Vorrichtung zur Erzeugung polarisierten Lichtes, eine Vorrichtung zur Aufnahme der Probe, eine Vorrichtung zur Aufmagnetisierung der Probe mit Magnetpulsen oder einem Magnetfeld variabler Frequenz, sowie eine Vorrichtung zur Analyse der Polarisationsrichtung polarisierten Lichtes enthält.

10

27. Verwendung einer Vorrichtung gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer optischen Bank ein Laser, ein Polarisator, eine Küvette mit der Probe, ein Analysator und ein Photodetektor angeordnet sind.

15

28. Verwendung einer Vorrichtung gemäß Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß sich zusätzlich zwischen der Probe und dem Analysator ein $\lambda/4$ -Plättchen befindet.

Fig. 1

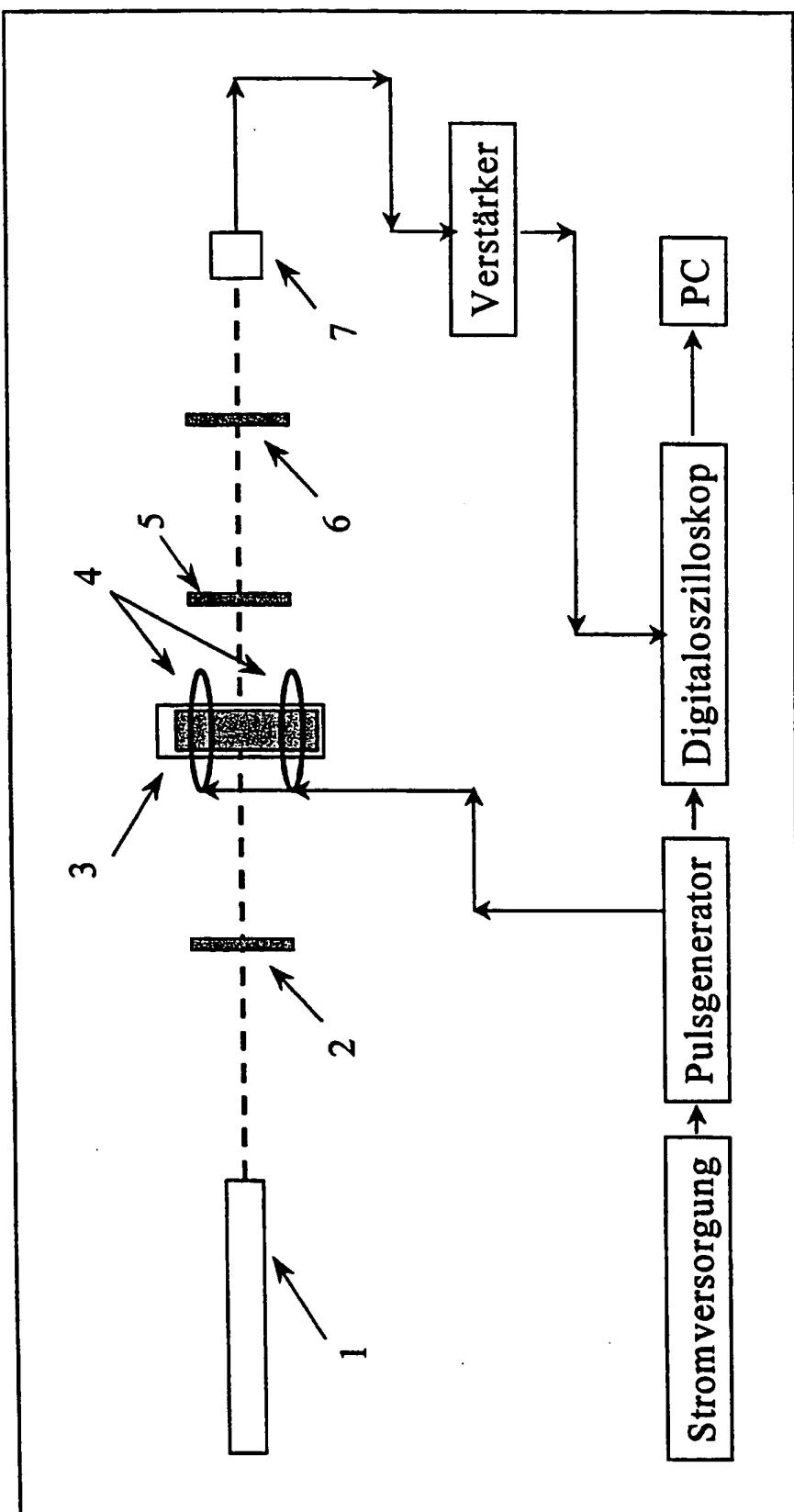
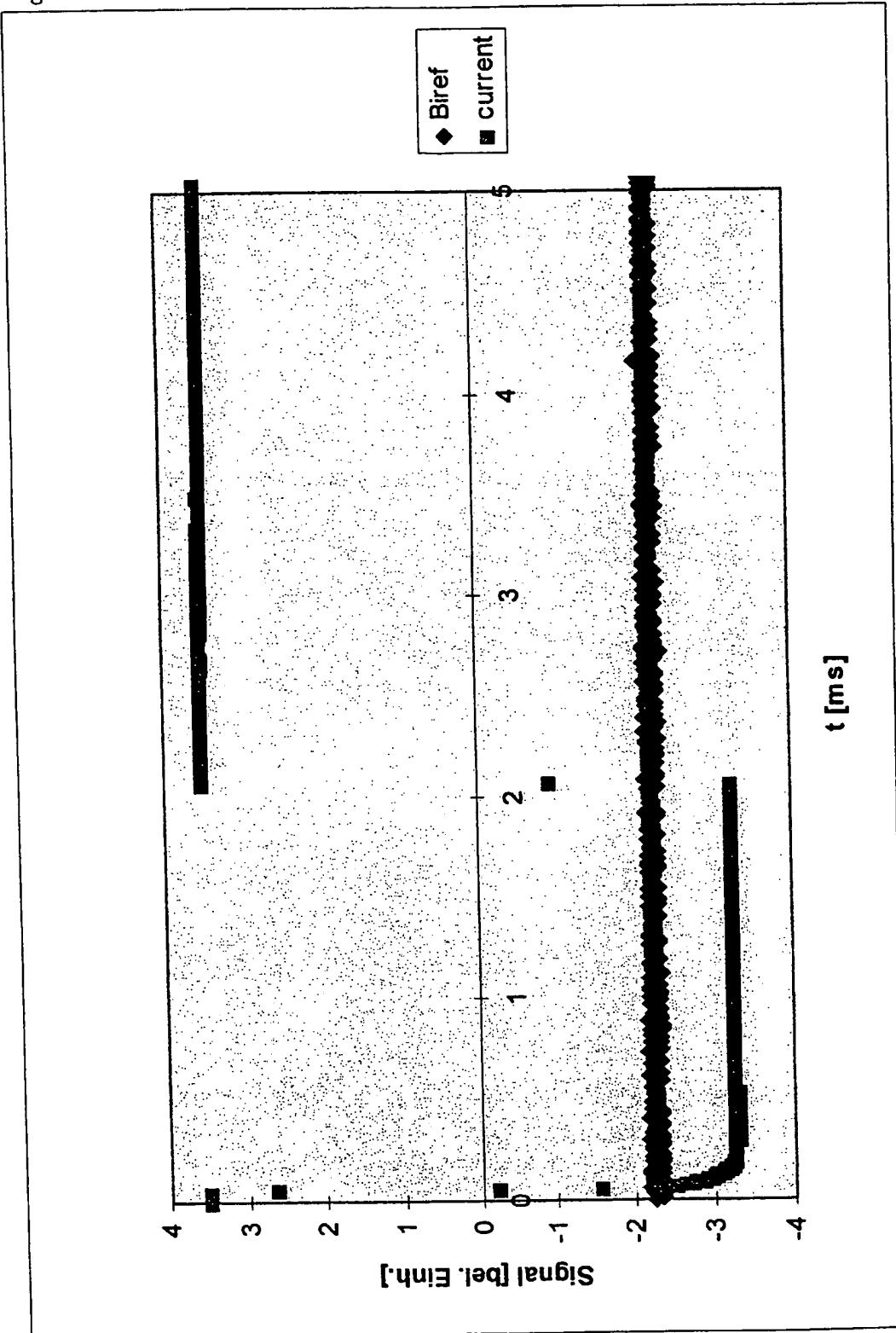
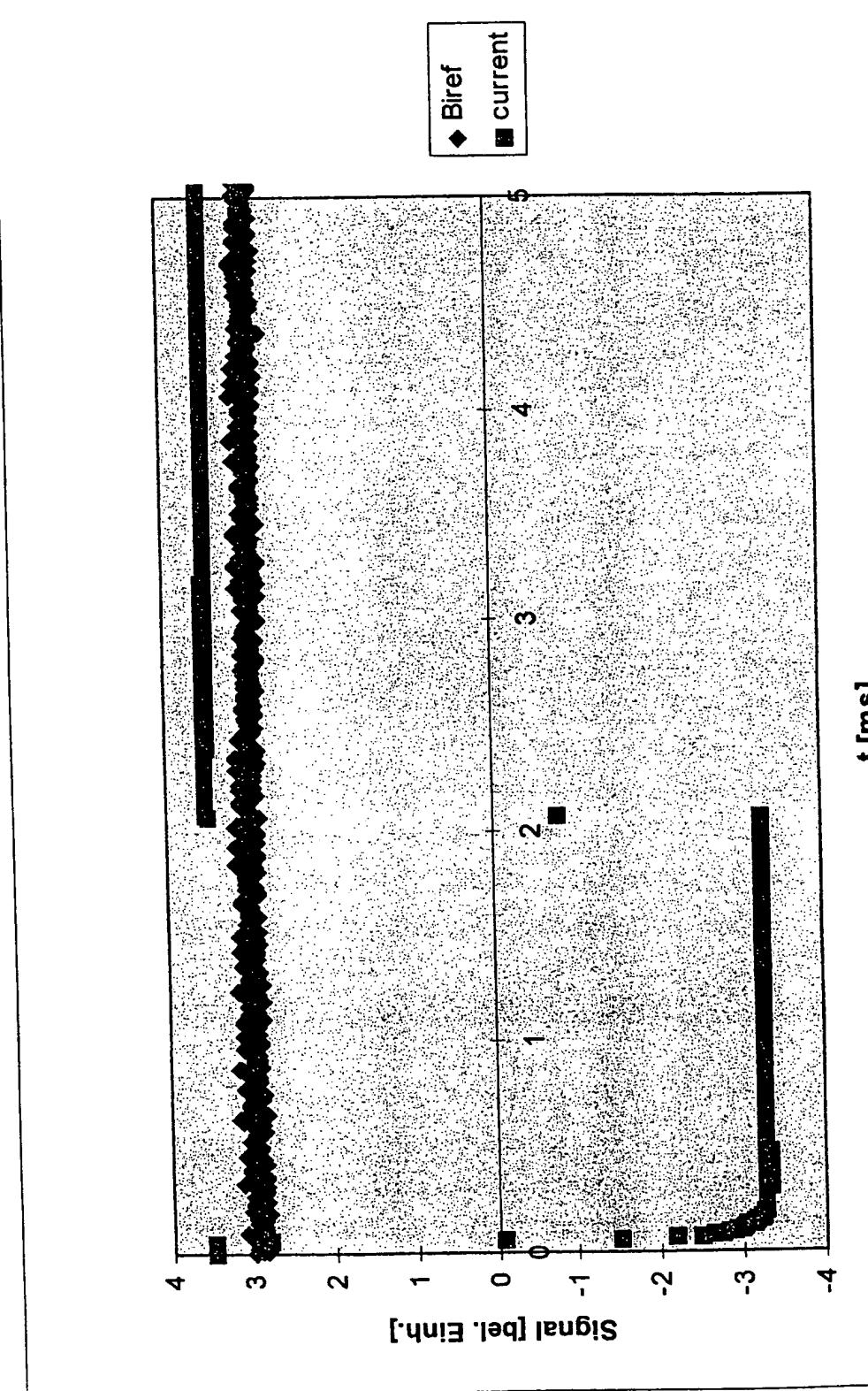


Fig. 2



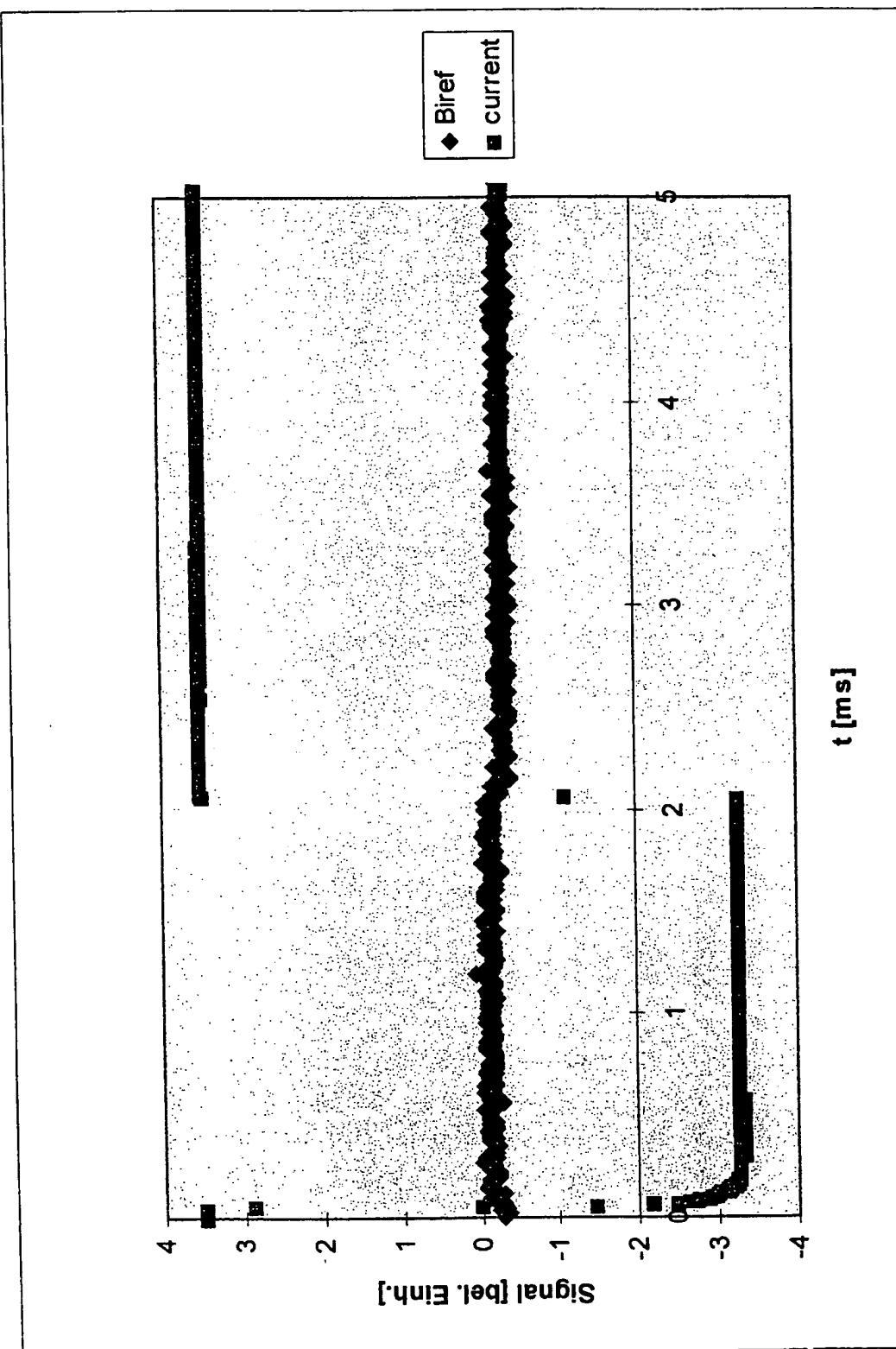
REST AVAILABLE COPY

Fig. 3



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 4



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5

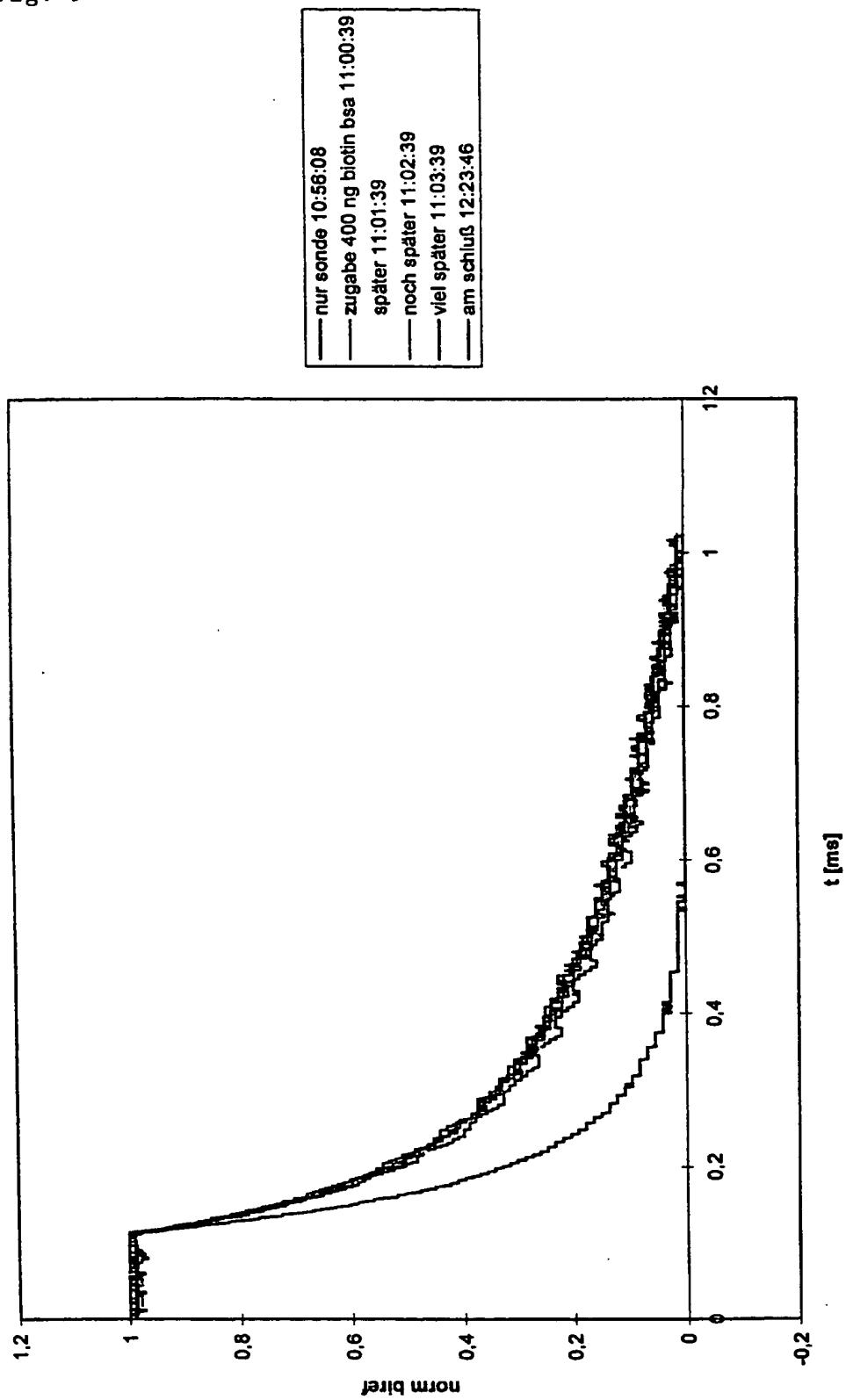


Fig. 6

